

Relaciones parentales de *Triatoma dimidiata* en una vivienda de El Cuje, Pueblo Nuevo Viñas, Santa Rosa.

María Carlota Monroy; Juan José Chávez; María Eugenia Morales-Betoulle; Patricia Landaverde; Antonieta Rodas; Eunice Enríquez; Silvia Bor; Sergio Melgar.

Laboratorio de Investigación en Entomología Aplicada y Parasitología. Escuela de Biología.
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala.

e-mail: cmonroy@usac.edu.gt, carlotamoroy@yahoo.com, lenap@usac.edu.gt
http://www.usac.edu.gt/~lenap

RESUMEN

El trabajo consistió en analizar por medio de la técnica de Amplificación al Azar de ADN Polimórfico (RAPDs) las relaciones de parentesco en una población de *Triatoma dimidiata* (Reduviidae, Triatominae) colectada en una sola vivienda humana, a lo largo de un año. La vivienda seleccionada se localizaba en la Aldea El Cuje, Municipio de Pueblo Nuevo Viñas, Departamento de Santa Rosa. Esta zona es considerada en Guatemala como de alta endemicidad de la enfermedad de Chagas.

Se colectaron 130 individuos *T. dimidiata* a los cuales se les extrajo el ADN de las patas y se amplificaron utilizando cebadores cortos u oligonucleótidos L1, L4, y H3 de la casa Operon. Los resultados de las ampliificaciones permitió el Análisis de 14 loci dominantes con frecuencias alélicas comprendidas entre 0.1 y 0.6. Se estimó en 17 el número de familias de "hermanos completos" (hermanos provenientes del mismo progenitor macho y hembra). El número de individuos que formaron cada familia y el número de familias reflejaron una endogamia moderada y pusieron en evidencia un flujo genético intradomiciliar. Se encontraron 6 familias que estaban formadas por tres o más hermanos completos y 11 familias con dos o menos hermanos del mismo padre y madre. Estas 11 familias pueden estar señalando flujos genéticos del exterior y/o poliandria.

Estos resultados son de suma utilidad para efectos de control, ya que una población con alta endogamia será fácilmente controlable, por los métodos tradicionales. No así una población que muestre alta diversificación. En el caso de *T. dimidiata* procedente de Pueblo Nuevo Viñas, la endogamia es moderada, lo que indica una especie en proceso de diversificación.

Estos resultados revelan que las estrategias de control de

T. dimidiata deben tomar en cuenta los movimientos poblacionales de la especie y el grado de endogamia de cada población.

INTRODUCCIÓN

Desde 1992 se han hecho varios estudios sistemáticos relacionados con la enfermedad de Chagas en Guatemala, especialmente enfocados a los vectores y su forma de control. Estos resultados mostraron la factibilidad y la conveniencia económica de invertir en el control de estos insectos (Tabaru *et al.*, 1999). En 1997 el Laboratorio de Investigación en Entomología y Parasitología de la Escuela de Biología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de San Carlos, juntamente con la Sección de Chagas y Leishmaniasis del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social del Gobierno de la república, presentaron un proyecto a la Agencia de Cooperación Japonesa (JICA) con el objetivo de buscar financiamiento para el rociamiento de 300,000 viviendas en el país. Este proyecto se aprobó parcialmente y tanto los fondos como los suministros y los colaboradores japoneses comenzaron a hacer efectivo este objetivo en el año 2000.

Sin embargo, estudios previos (Monroy *et al.*, 1998; Córdón-Rosales 2000) han demostrado que *T. dimidiata* vuelve a encontrarse en la vivienda humana al poco tiempo después del rociamiento con insecticidas piretroides, por lo que estudios sobre la dinámica y diferencias poblacionales son prioritarios. Para contribuir a la evaluación de estos parámetros se utilizó la Amplificación al Azar de ADN Polimórfico en chinches que habitan una misma vivienda humana a lo largo de un año en una zona de alta endemicidad de la enfermedad, esto con el objeto de obtener información del grado de parentesco de las chinches en esa vivienda e inferir información sobre el grado de endogamia que presentan estas chinches en una sola vivienda humana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 130 chinches de una sola vivienda humana ubicada en la aldea el Cuje del Municipio de Pueblo Nuevo Viñas, departamento de Santa Rosa. Perteneciente a doña Eulogia López.

Los especímenes fueron colectados durante más de un año de colectas mensuales y fueron trasladados al laboratorio en donde se les cortaron las patas para extracción de ADN.

El ADN fue amplificado con los oligonucleótidos de la casa Operon: L1 (5'CGG CCC CTG G 3'), L4 (5'GTG GAT GCG A 3'), H3 (5' CAT CCC CCT G 3') llamados primers. Los amplicones fueron colocados en geles teñidos con bromuro de etidio para detectar en forma de bandas, los alelos dominantes. Los geles fueron digitalizados con una cámara Olympus y analizados utilizando el programa RFLPscan. Con el programa Mcal se seleccionaron los loci con frecuencias alélicas entre 0.1 y 0.6. El cálculo suponía que la población estudiada estaba en equilibrio Hardy Weinberg y que las bandas detectadas eran alelos dominantes. Los alelos con frecuencias no comprendidas entre 0.1 y 0.6 fueron descartadas. Estos datos fueron ingresados al programa Fingers para estimar el número de familias existentes.

Las huellas "dactilares" genéticas han sido utilizadas ampliamente para estudiar la organización social de numerosas especies (Apóstol, et al, 1992). Generalmente para las huellas "dactilares" genéticas o "fingerprinting" se han utilizado VNTR's (Números Variables de Repeticiones en Tandems). Sin embargo hace más o menos una década Welsh y McClelland introdujeron una nueva forma para detectar polimorfismo. Esta técnica es el RAPD's, una modificación del PCR. El RAPD's, Amplificación al Azar de ADN Polimórfico, utiliza un solo tipo de "primer", corto, de unos 10 pares de bases. El tamaño pequeño de este "primer" aumenta considerablemente las probabilidades para que se una en distintos puntos del genoma. Si se unen suficientemente cerca dos "primers" en una y otra hebra de la doble hélice de ADN, la Taq polimerasa podrá amplificar esa región, dando lugar a un fragmento con un peso molecular determinado. Como las probabilidades para que se una en distintos sitios son elevadas, la Taq polimerasa podrá amplificar otros fragmentos con pesos moleculares distintos. El conjunto de fragmentos amplificados es lo suficientemente variable para poder detectar polimorfismo entre individuos de una misma especie con esta técnica. Se asume que estos fragmentos amplificados son loci dominantes que se segregan independientemente, o sea que pueden ser considerados como loci individuales. Las ventajas del RAPD's son que se requiere poca cantidad de ADN, la detección de los amplicones (fragmentos amplificados) es no radiactiva, es un proceso relativamente rápido comparado con otras técnicas clásicas, y no se necesita información

previa acerca de la secuencia de nucleótidos.

El primer paso después de amplificar las muestras y correrlas en los geles de agarosa fue identificar cada uno de los loci replicados, es decir detectar cada una de las bandas. Para esto se utilizó el programa de análisis de imágenes RFLPscan, un programa especializado para este tipo de estudio. Este programa tradujo la fotografía de cada uno de los geles a una matriz binaria de "0" y "1", siendo el "0" la ausencia de banda y el "1" la presencia. Con esta matriz fue posible calcular la fracción de bandas compartidas como ausencias y presencias. Se amplía la información proporcionada por la matriz considerando los alelos recesivos. El número de coincidencias "M" (de "matches" en inglés) se calculó con la siguiente fórmula $M = N_{ab} / N_t$ siendo N_{ab} el total de bandas coincidentes entre los individuos a y b, y N_t , el total de bandas consideradas en el estudio. Un valor M de 1 indica que los individuos a y b comparten un mismo patrón de bandeo y un M de 0 indica que el patrón entre los individuos a y b es completamente diferente. Para estimar el número de familias entre individuos emparentados, medio emparentados y no emparentados hay que estimar el valor 1-M. Esto es necesario para minimizar la probabilidad de incluir a un individuo no emparentado en un grupo de individuos hermanos completos, y viceversa debido a la varianza elevada al considerar parentescos (Apóstol, et al 1992). El valor de 1-M permite seleccionar a las familias de hermanos completos, estando éstas agrupadas con valores inferiores a ese valor. Para determinar el valor de 1-M, se seleccionaron previamente loci con frecuencias alélicas comprendidas entre 0.1 y 0.6. Esto se hizo colectando individuos de *Triatoma dimidiata* aledañas a la casa de estudio, para tener el marco de referencia de frecuencias genéticas de la región estudiada. Apóstol, et al demostraron que valores debajo de 0.1 ó arriba de 0.6 no son adecuados para estimar el número de familias, ya que alelos con frecuencias muy bajas debajo de 0.1, subestimarían el grado de parentesco entre individuos, ya que son alelos poco frecuentes de por sí en la población. Valores superiores a 0.6 harían lo contrario; sobreestimarían el parentesco, ya que son alelos frecuentes en la población. Así dos individuos compartirían el mismo alelo no por estar emparentados sino porque el alelo considerado es recurrente en la población. Para poder seleccionar los loci se estudiaron 21 individuos amplificados exitosamente con los tres primers L1, L4 y H3 de la casa Operon, colectados alrededor de la casa en estudio. Con el programa Mcalc, del paquete RAPD's de W.Black, se seleccionaron los loci con frecuencias alélicas entre 0.1 y 0.6. El cálculo supone que la población estudiada está en equilibrio Hardy-Weinberg, y que las bandas presentes son alelos dominantes. Los alelos con frecuencias no comprendidas entre 0.1 y 0.6 fueron descartados en la matriz con los individuos colectados en la vivienda de estudio. Luego esa nueva matriz se ingresó al programa Fingers del mismo paquete de W.Black y se estimó el número de familias.

RESULTADOS

*En las tablas 1 y 2 se muestra el número de individuos *Triatoma dimidiata* amplificados con los distintos primers, señalando cuáles fueron seleccionados para calcular las frecuencias génicas de las casas aledañas y de la casa en estudio.*

Tabla 1

Primer utilizado	L1	L4	H3
Número de individuos para seleccionar los alelos con frecuencias génicas entre 0.1 y 0.6 cuyo ADN fue amplificado exitosamente	30	35	25
Número de individuos colectados en la casa de estudio para estimar el tamaño y número de las familias, cuyo ADN fue amplificado exitosamente.	100	90	51

Tabla 2

	Individuos colectados en casas aledañas	Individuos colectados en la casa de estudio
Número de individuos en común del cuadro anterior amplificados exitosamente con L1 y L4 y H3	21	41

Ejemplo de los patrones de amplificación obtenidos con los primers entre los individuos colectados en casas aledañas a la casa de estudio para seleccionar los alelos con frecuencias génicas entre 0.1 y 0.6.

Primer L1

La Tabla 3 muestra las frecuencias génicas entre 0.1 y 0.6 de los individuos *T. dimidiata* colectados en las casas aledañas a la casa de estudio.

Tabla 3

	Loci	L1-8	L1-9	L1-12	L1-14	L1-17	L1-24	L4-13	L4-18	L4-26	H3-6	H3-12	H3-14	H3-16	H3-19
"A"	p	0.31	0.10	0.18	0.42	0.10	0.28	0.47	0.51	0.13	0.56	0.28	0.10	0.42	0.15

Loci con la frecuencia "p" del alelo dominante "A" comprendidas entre 0.1 y 0.6 determinadas entre individuos colectados en casas aledañas a la casa de estudio.

La tabla 4 muestra las frecuencias génicas, valores M y 1-M de los individuos colectados en la casa estudiada

Tabla 4

Loci	Frecuencias		M	1-M
	q	p		
L1-8	0.7868	0.2132	0.7501	0.2499
L1-9	0.8997	0.1003	0.8417	0.1583
L1-12	0.4364	0.5636	0.8156	0.1844
L1-14	0.4880	0.5120	0.7874	0.2126
L1-17	0.7237	0.2763	0.7306	0.2694
L1-24	0.5345	0.4655	0.7650	0.2350
L4-13	0.6172	0.3828	0.7363	0.2637
L4-18	0.9759	0.0241	0.9544	0.0456
L4-26	0.8997	0.1003	0.8417	0.1583
H3-6	0.3086	0.6914	0.8911	0.1089
H3-12	0.4880	0.5120	0.7874	0.2126
H3-14	0.9759	0.0241	0.9544	0.0456
H3-16	0.5774	0.4226	0.7480	0.2520
H3-19	0.8729	0.1271	0.8124	0.1876

$$M = p^4 + 4p^3(1-p) + 2p(1-p)^3 + 4.5p^2(1-p)^2 + (1-p)^4$$

1-M promedio = 0.1849

Frecuencias "q" y "p" de los alelos "a", recesivos y "A" dominantes, respectivamente; valores M y 1-M, determinados con los individuos colectados en la casa de estudio.

Ejemplo de patrones de amplificación obtenidos con el primer L1 entre los individuos colectados en la casa de estudio.

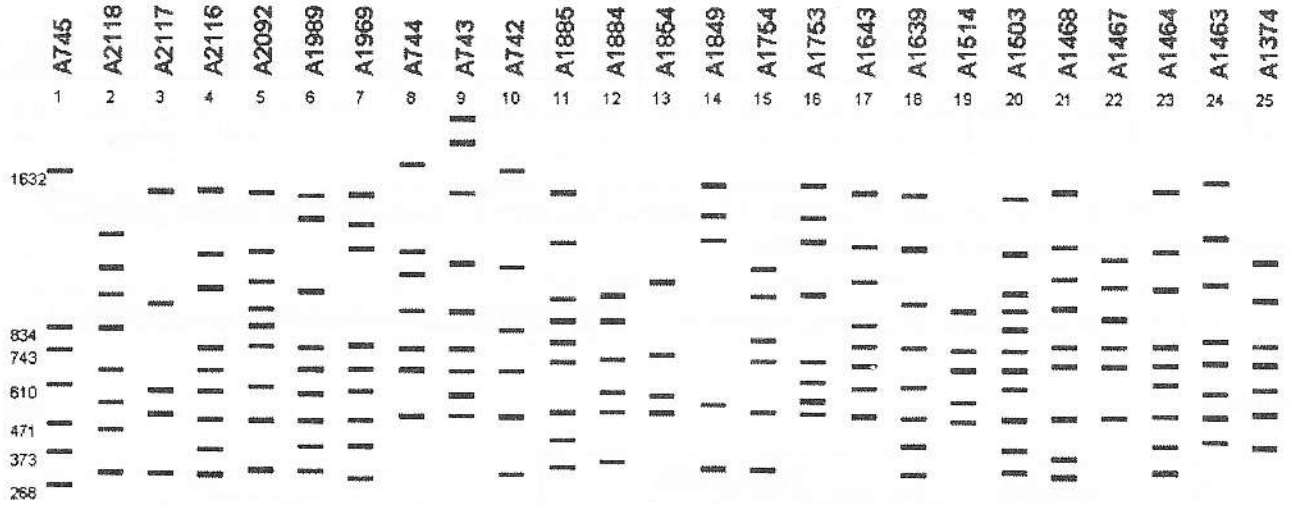
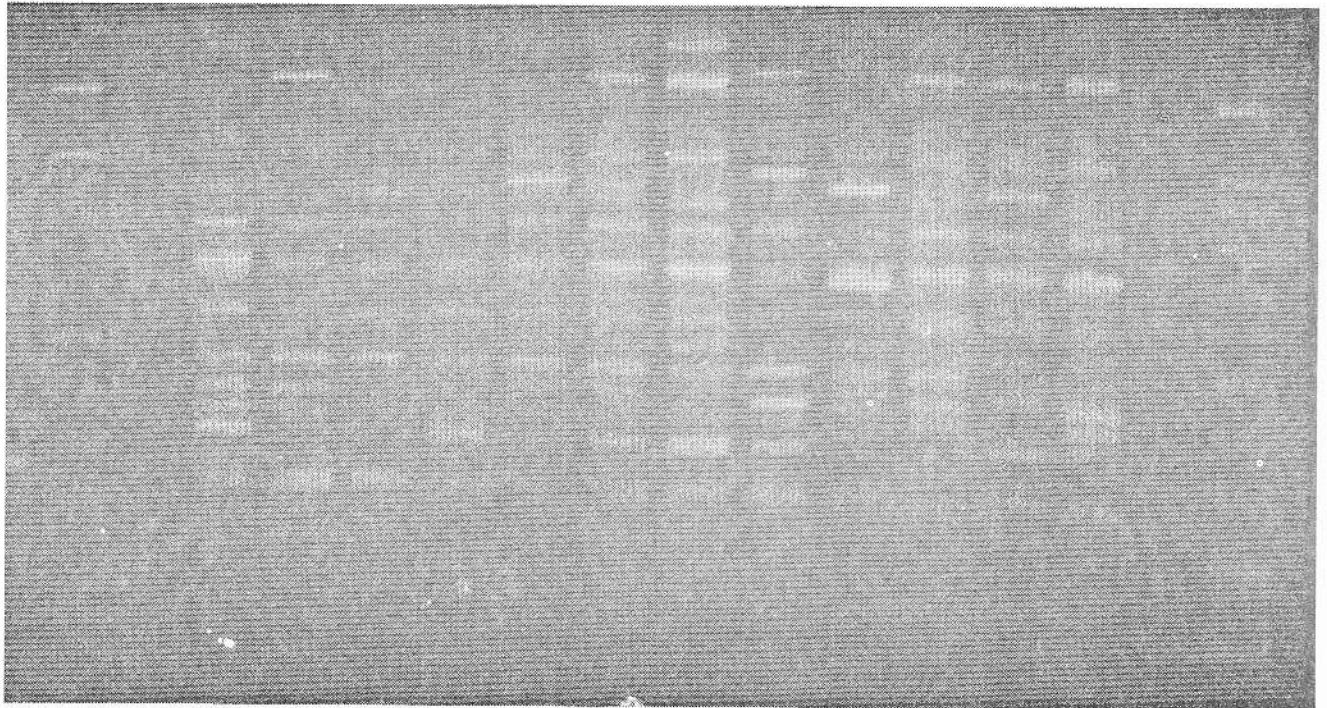
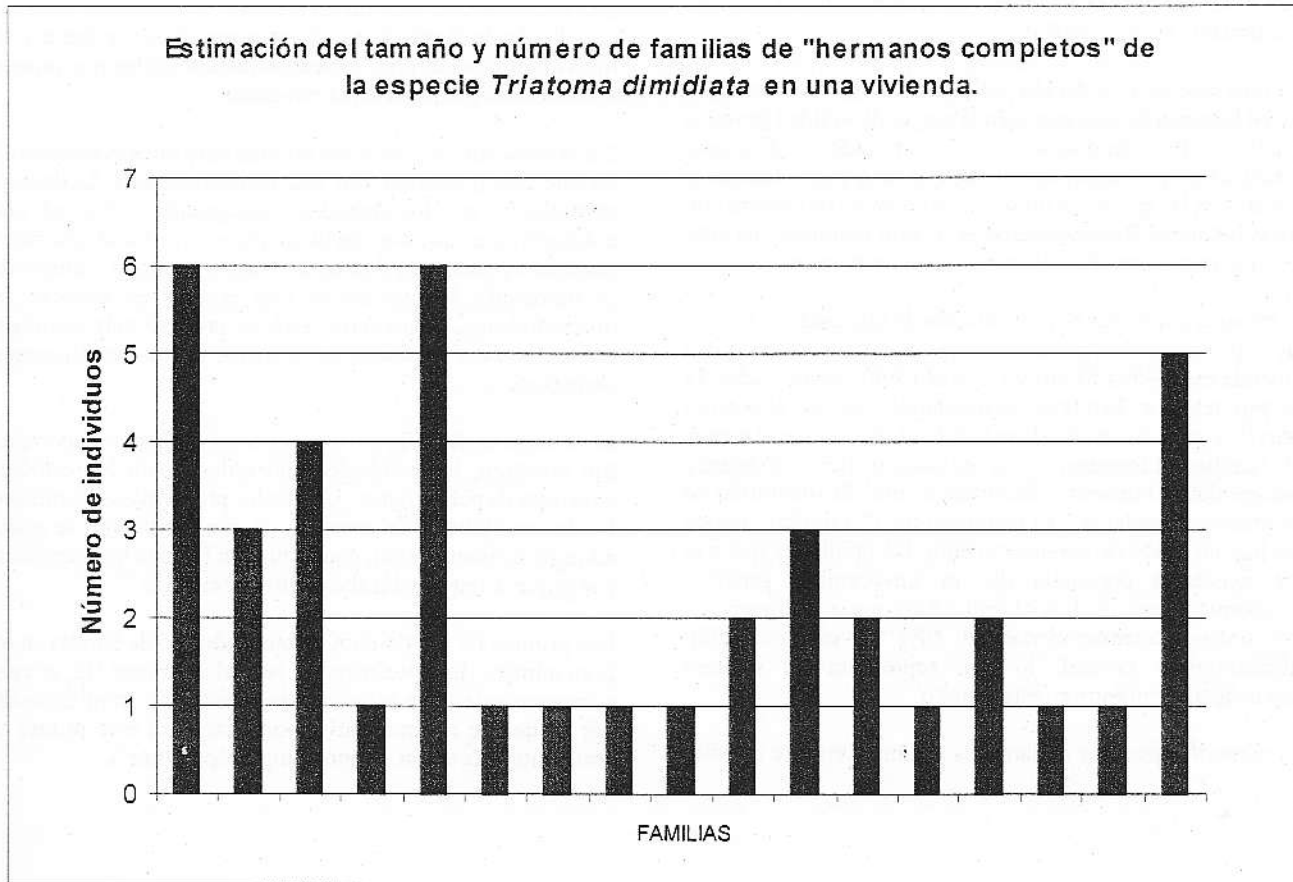


Figura 1

Ejemplo del corrimiento de los amplicones en un gel de agarosa.



Gráfica 1



Número de familias detectadas con un umbral (1-M) de 0.1846. El tamaño promedio de las familias es 2.41 con una desviación estándar de 1.80.

DISCUSION DE RESULTADOS

El estudio genético se realizó con las chinches *T. dimidiata* colectadas en la casa de Doña Eulogia López de la aldea el Cuje del Municipio de Pueblo Nuevo Viñas, Santa Rosa. Con el análisis de los resultados se consideraron 14 loci y se determinaron 17 familias de las cuales 8 estaban constituidas por un solo individuo, 6 por familias de 2 a 5 individuos y tres familias con una cantidad superior a 5 individuos. El número de familias y el número de individuos en cada familia muestran que esta población tiene cierto grado de endogamia.

En efecto se pudieron determinar familias representadas por más de 4 individuos lo que muestra tendencia endogámica, subrayada por el número de individuos que son "hermanos

completos, hermanos del mismo padre y madre". Esto para efectos de control es favorable, ya que estas familias serán las más susceptibles a las estrategias de rociamiento. Esta poca movilidad de las familias debe ser objeto de estudio, ya que encontrar las barreras que impiden el desplazamiento permitiría facilitar el control.

Ocho familias están formadas por un solo individuo. Esto significa que estos individuos presentan un patrón genético distinto al resto de las familias, lo que señala que hay diversificación genética de esa especie en una sola vivienda. Este hecho debe ser explicado a través de un proceso por el cual *T. dimidiata* está garantizando la diversificación de su especie. Una de las posibilidades para explicar este fenómeno

está relacionado con los resultados mostrados en morfometría en la región de Ixwatán, Agua Zarca, que muestran que los individuos se mueven de la época seca a la época lluviosa (Bustamante D. *et al.*, 2001).

Por otro lado la fecundación poliándrica es un fenómeno por el cual las especies se garantizan la mayor diversidad genética posible. Este fenómeno se ha encontrado en *Triatoma brasiliensis* en donde los machos de la especie tienden a moverse en las épocas de lluvias con el objeto de copular con varias hembras. Recientemente el mismo fenómeno ha sido descrito para *T. dimidiata* (Monroy *et al.* en preparación).

En trabajos anteriores por demolición de viviendas se mostró que el promedio de individuos de *Triatoma dimidiata* en una vivienda es de 400, (Monroy C., *et al.* 1998) de los cuales 42 corresponden a hembras oviponiendo. Si la población estuviera muy diversificada se hubieran encontrado al menos 30 familias diferentes, si la población fuera altamente endogámica se hubieran encontrado no más de 10 familias de "hermanos completos". El resultado de 17 familias indica que hay un grado de parentesco entre las familias y que a la vez existe la presencia de un intercambio genético intradomiciliariamente. Los 41 individuos que se analizaron en este trabajo corresponderían al 10% de una población intradomiciliar normal, lo que representa un número adecuado de la muestra en este estudio.

El número superior a 10 familias estimado en este estudio,

podría estar reflejando la existencia de algún proceso por el cual *Triatoma dimidiata* contrarresta la endogamia. Estos procesos pueden ser la selección de machos para la copulación, la copulación con varios machos, o el ingreso de individuos con patrones genéticos distintos a los que poseen los individuos en la vivienda estudiada.

Estos resultados son de suma utilidad para efectos de control, ya que una población con alta endogamia será fácilmente controlable, por los métodos tradicionales. No así una población que muestre alta diversificación. En el caso de *T. dimidiata* procedente de Pueblo Nuevo Viñas, la endogamia es moderada, lo que indica una especie en proceso de diversificación, y su control será un proceso más complejo que en el caso de *Rhodnius prolixus*, el cual es altamente endogámico.

El método de RAPDs-PCR resultó ser altamente laborioso. Sin embargo, los resultados son útiles para los estudios genéticos de poblaciones. Uno de los problemas encontrados fue la sensibilidad del método, ya que fácilmente se podía adquirir contaminación, dando lugar a bandas inespecíficas; por lo que se requirió un alto control de calidad.

Los primers L1 y L4 dieron un buen número de bandas en un gran número de especímenes. No así el primer H3, el cual aparentemente tiene otros requerimientos de amplificación, por lo que se recomendaría modificar para este primer la temperatura de unión. ("annealing temperature").

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Audesirk T., Audesirk G., 1996 *Biología, La Vida en la Tierra. 4ta edición Prentice Hall, México.*
2. Becker M. 1981. The wing venation in *Macrosleste sxxnotatur* (Fallen, 1806) (Homoptera: Cicadillidae) and the occurrence of a short winged form. *Anais da Sociedade Entomologica do Brasil* 10 (2)
3. Christensen, H. Sousa, O. de Vasquez, AM. 1988. Host Feeding profiles of *Triatoma dimidiata* in Peridomestic Habitats of Western Panama. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 38(3), pp 477-479 (87-273).
4. Dujardin, J P, Cardozo L and Schofield C. 1996. Genetic analysis of *Triatoma infestans* following insecticidal control interventions in central Bolivia. *Acta Trópica* 61:263-266
5. Dujardin, JP, Bermudez, H. Casini, C. Schofield, C. Tibayrenc, M. 1997. Metric Differences Between Silvatic and Domestic *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) in Bolivia. *J. Med. Entomol.* 34(5): 544-551.
6. Elseth G., Baumgardner K., 1995 *Principles of Modern Genetics, West Publishing Company, USA.*
7. Howell V. Daly. 1985. Insect morphometrics. *Ann. Rev. Entomol* 30:415-438
8. Giojalas, LC. Catala, SS. Asin, SN. Gorla, DE. 1990. Seasonal changes in infectivity of domestic populations of *Triatoma infestans*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 84, 439-442.
9. Gorla, DE. Schofield, CJ. 1989. Population dynamics of *Triatoma infestans* under natural climatic conditions in the Argentine Chaco. *Med. Vet. Ent.* 3, 179-194.
10. Gürtler, R. Cecere, M. Rubel, D. Schweigmann, N. 1992. Determinants of the domiciliary density of *Triatoma infestans*, vector of Chagas disease. *Med. Vet. Ent.* 6, 75-83.
11. Lent, H. Wygodzinsky, P. 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* Vol. 163:123-520. New York.
12. Monroy C, Mejía M, Rodas A, Hashimoto T and Tabaru Y. 1998. Assessing methods for the density of *Triatoma dimidiata* the principal vector of Chagas disease in Guatemala. *Med. Entomol. Zool* 49(4): 301-307
13. Monroy C, Mejía M, Rodas A, Rosales R, Horio M and Tabaru Y. 1998. Comparison of indoor searches with whole house demolition collections of the vectors of Chagas disease in their indoor distribution. *Med. Entomol. Zool* 49(3) : 195-200
14. Negreros, MP, 2000. Identificación de mamíferos como reservorios silvestres de la enfermedad de Chagas (*Trypanosoma cruzi*) en Olopa, Chiquimula, Guatemala. En *Libro de Resúmenes. IV Congreso de la Sociedad Mesoamericana para la Biología y la Conservación.* Jaramillo, C. Ibáñez, R. Solís, F. Luna, I. Editores.
15. Schofield, CJ. 1985. Population dynamics and control of *Triatoma infestans*. *Ann. Soc. Belge Med. Trop.* 65, Suppl. 1, 149-164.
16. Schofield, CJ. Lehane, MJ. McEwan, P. Catala, SS. Gorla, DE. 1992. Dispersive flight by *Triatoma infestans* under natural climatic conditions in Argentina. *Med. Vet. Ent.* 6, 51-56.
17. Schofield, CJ. Lehane, MJ. McEwan, P. Catala, SS. Gorla, DE. 1991. Dispersive flight by *Triatoma sordida*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 85, 676-678.
18. Shleif, R., 1993 *Genetics and Molecular Biology* 2nd edition The Johns Hopkins University Press, USA.
19. Shofield, C.J., 1994 Triatominae, Biología y Control, Zeneca Public Health Eurocommunica Publications.
20. Solis, S. 2000. Genetic variability and morphometrics of *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) geographical populations. *London School of Hygiene & Tropical Medicine. Londres. Manuscrito no publicado.*
21. Tabaru Y, Monroy C, Rodas A, Mejía M and Rosales R. 1998. Chemical control of *Triatoma dimidiata* and *Rhodnius prolixus* (Reduviidae: Triatominae), the principal vectors of Chagas disease in Guatemala. *Med. Entomol. Zool.* 49 (2) : 87-92
22. Wisnivesky-Colli, C. Schweigmann, N. Pietrokovsky, S. Bottazzi, V. Rabinovich, J. 1997. Spatial distribution of *Triatoma guasayana* (Hemiptera: Reduviidae) in hardwood forest biotopes in Santiago del Estero, Argentina. *J. Med. Entomol.* 34(2): 102-109.
23. Wisnivesky-Colli, C. Gürtler, R. Solarz, N. Schweigmann, N. Pietrokovsky, S. Alberti, A. Flo, J. 1993. Dispersive flight and house invasion by *Triatoma guasayana* y *Triatoma sordida* in Argentina. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 88(1): 27-32, jan/mar.*
24. Zeledón, R. Solano, G. Zuñiga, A. Swartzwelder, JC. 1973. Biology and Ethology of *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811). (III. Habitat and Blood Sources). *J. Med. Ent.* Vol. 10, no. 4: 363-370.